Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 2, May-June 2024, p. 295-308

Using Microwave Pretreatment in the Enzymatic Hydrolysis of Pumpkin Seed Protein (*Cucurbita maxima* L.) by Alcalase and Investigating Its Antioxidant Properties

Z. Nooshi Manjili[1], A. Sadeghi Mahoonak[2]*, V. Erfani-Moghadam[3,4], M. Ghorbani[2], H. Shahriri Tabarestani[5]

1, 2 and 5- Ph.D. Student of Food Chemistry, Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: sadeghiaz@gau.ac.ir
3- Cancer Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
4- Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Received: 12.06.2023
Revised: 06.12.2023
Accepted: 09.12.2023
Available Online: 09.12.2023

How to cite this article:
Nooshi Manjili, Z., Sadeghi Mahoonak, A., Erfani-Moghadam, V., Ghorbani, M., & Shahriri Tabarestani, H. (2024). Using microwave pretreatment in the enzymatic hydrolysis of pumpkin seed protein (*Cucurbita maxima* L.) by alcalase and investigating its antioxidant properties. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *20*(2), 295-308. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82861.1264

Introduction

Seeds and nuts have received increasing attention due to their nutritional value and the high therapeutic properties of their bioactive compounds. Most of the seeds are used as nuts, and some of them are considered agricultural waste. Pumpkin seeds have a high content of protein (30–40% in terms of dry matter). Proteins are among the vital health-giving components that provide nitrogen, essential amino acids and energy necessary for normal cells. Pumpkin seeds are a good source of amino acids such as valine, histidine, isoleucine, leucine, threonine and methionine. Protein hydrolysate is a mixture of peptides and amino acids that can show antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic and antihypertensive properties. During hydrolysis, proteins are broken into small peptides and amino acids. Since enzymatic hydrolysis is performed in relatively mild conditions and no amino acid damage occurs, this type of hydrolysis is preferred over acid and alkaline hydrolysis. Hydrolysates obtained from pumpkin seed protein have bioactive properties, especially antioxidant activity. Pretreatment of proteins before enzymatic hydrolysis acts to improve the release of bioactive peptides from different proteins. Pretreatment can facilitate the unfolding the structure of proteins and thus increase the access of enzymes to peptide bonds. The main properties of microwaves usually show three characteristics: penetration, reflection and absorption. Microwave assisted enzymatic hydrolysis can shorten the time and improve the speed of the reaction. The purpose of this research was to investigate the antioxidant activity of pumpkin seed protein hydrolysates (*Cucurbita maxima* L.) by alcalase enzyme in two conditions: without pretreatment and using microwave pretreatment.

Material and Methods

In this study, Pumpkin (*Cucurbita maxima* L.) was purchased from the local market of Astane Ashrafieh in Gilan province. The seeds were scooped manuallyand then dried in an oven at 50°C for 72 hours. After the production of protein concentrate from pumpkin seeds, the chemical properties of the concentrate, such as the amount of fat, protein, ash and moisture, were measured. The isolated pumpkin seed solution was exposed to

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82861.1264

microwave energy with a power of 450-900 watts for 30–90 seconds and was used as a substrate solution in enzymatic hydrolysis experiments. It should be noted that after measuring the total antioxidantactivityr for different powers and times of microwave pretreatment, the power of 600 watts for 60 seconds was selected and applied before enzymatic hydrolysis. Enzymatic hydrolysis was done by alcalase enzyme with a concentration of 0.5 to 2.5% compared to the protein substrate during 20 to 190 minutes, and the optimum temperature and pH of alcalase were determined in order to produce hydrolysates with antioxidant activity. Antioxidant activity was measured by using DPPH free radical inhibition, total antioxidant activity and iron chelation activity methods.

Result and Discussion

Bioactive peptides produced by the enzymatic hydrolysis of proteins have significant antioxidant properties. Pumpkin seeds can be used as a rich source of nutrients and bioactive compounds in various food industries. The results showed that the maximum amount of antioxidant activity without pre-treatment was achieved in 165 minutes with a 2.2% ratio of E/S by using DPPH free radical scavenging activity (40.5%), total antioxidant power (0.79), and iron chelation activity (96.2%) methods. By using microwave pre-treatment, the maximum amount of antioxidant activity was achieved in a shorter time and with less enzyme (105 minutes and E/S ratio 1.5%) using DPPH free radical scavenging (52%), total antioxidant power (0.711), and iron chelation activity (93%). Therefore, it can be concluded that using microwave assisted enzymatic hydrolysis , in addition to achieving hydrolysates with proper antioxidant activity, is a suitable method to save time and reduce enzyme concentrations used in enzymatic hydrolysis.

Keywords: Antioxidant activity, Microwave pretreatment, Protein hydrolysates, Pumpkin seeds

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۲۰، شماره ۲، خرداد-تیر ۱٤۰۳، ص. ۳۰۸-۲۹۵

استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو (*Cucurbita maxima* L.) توسط آلکالاز و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی آن

زینب نوشی منجیلی[۱]- علیرضا صادقی ماهونک[۲]*- وحید عرفانی مقدم[۳،٤]- محمد قربانی[۲]- هدی شهیری طبرستانی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۸

چکیده

دانه کدو دارای محتوای پروتئین بالایی (۴۰-۳۰ درصد برحسب ماده خشک) است. بخش اعظم دانه‌ها به شکل آجیل مورد استفاده قرار می‌گیرند و بخشی از آن نیز جزو ضایعات کشاورزی محسوب می‌شوند. هیدرولیز شده‌های حاصل از پروتئین دانه کدو دارای خواص زیست‌فعالی، بویژه فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. در این پژوهش محلول محتوی ایزوله پروتئین دانه کدو در معرض پیش‌تیمار مایکروویو با توان ۹۰۰-۴۵۰ وات به مدت ۹۰-۳۰ ثانیه قرار گرفت و به‌عنوان محلول سوبسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. هیدرولیز آنزیمی توسط آلکالاز، با غلظت ۲/۵-۰/۵ درصد وزنی نسبت به سوبسترای پروتئینی، در بازه زمانی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه، در دما و pH اپتیمم آلکالاز، به‌منظور تولید هیدرولیز شده‌هایی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی انجام گرفت. قدرت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت شلاته‌کنندگی آهن اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط بدون پیش‌تیمار، طی زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت E/S ۲/۲ درصد با قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH (۴۰/۵ درصد)، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (۰/۷۹) و شلاته‌کنندگی آهن (۹۶/۲ درصد) بدست آمد. درحالی‌که با اعمال پیش‌تیمار مایکروویو، بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمانی کوتاه‌تر و غلظت آنزیم کمتر (۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد)، با قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۲ درصد)، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (۰/۷۱۱) و شلاته‌کنندگی آهن (۹۳ درصد) بدست آمد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی، علاوه بر دستیابی به هیدرولیز شده‌هایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مناسب، موجب صرفه‌جویی در زمان و غلظت آنزیم مورد استفاده در طی هیدرولیز نیز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، پیش‌تیمار مایکروویو، دانه کدو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

دانه‌ها و آجیل‌ها، به‌دلیل ارزش تغذیه‌ای و خواص درمانی بالای اجزای زیست‌فعال آن‌ها، موردتوجه روزافزون قرار گرفته‌اند (Shandilya & Sharma, 2017; Yang *et al*., 2019). دانه کدو[۶] منبع خوبی از پروتئین (۴۰-۳۰ درصد برحسب ماده خشک) می‌باشد. پروتئین دانه کدو سرشار از اسیدهای آمینه ضروری نظیر والین، هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، ترئونین و متیونین می‌باشد (Lu *et al*., 2021). طی هیدرولیز، پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدها

۱، ۲ و ۵- به‌ترتیب دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، استاد و استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: sadeghiaz@gau.ac.ir)
۳- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۴- استادیار گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.82861.1264
6- *Cucurbita pepo* L.

شکسته می‌شوند. ازآنجا که هیدرولیز آنزیمی در شرایط نسبتاً ملایمی انجام می‌شود و هیچ‌گونه آسیبی به ساختار آمینواسیدها وارد نمی‌شود، این نوع هیدرولیز به هیدرولیز اسیدی و قلیایی ترجیح داده می‌شود (Taha *et al.*, 2013). مطالعات نشان می‌دهد که پروتئین‌های حاصل از دانه کدو، مشابه سویا، دارای مقادیر بالای فراهمی‌زیستی آمینواسیدها می‌باشند (Rezig *et al.*, 2013). یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2019) بیان کردند که ساختار گلوبولین پروتئین دانه کدو مشابه دانه حبوبات است. این نکته مهم در مورد شباهت تغذیه‌ای، ممکن است اثرات مخرب مرتبط با سوء تغذیه پروتئینی را کاهش دهد. علاوه بر این، پروتئین‌های جداشده از دانه‌های کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی مناسبی هستند (Nkosi, 2007; Sarkar *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2019). مطالعات اخیر نشان دادند که هیدرولیز شده‌های حاصل از پروتئین دانه کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده (Mazloomi-Kiyapey *et al.*, 2019; Sitohy *et al.*, 2020) و همچنین زیست دسترس‌پذیری روی را افزایش می‌دهند (Lu *et al.*, 2021). هیدرولیز شده‌های حاصل از منابع پروتئینی مختلف، دارای ویژگی‌های زیست‌فعالی متنوعی می‌باشند. دانه کدو دارای خواص آنتی اکسیدانی (Nourmohammadi *et al.*, 2016)، دانه بامیه دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی (Nnamezie *et al.*, 2021)، دانه چیا دارای ویژگی‌های ضد فشار خون و آنتی‌اکسیدانی (Villanueva-Lazo *et al.*, 2021) و "سایر دانه‌های روغنی" با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد فشار خون و ضد دیابت (Han *et al.*, 2021) می‌باشند. پپتیدهای زیست‌فعالی که از منابع مختلف طی هیدرولیز آنزیمی به دست می‌آیند دارای ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی و تشکیل کف (به‌عنوان مثال، سویا) (Horax *et al.*, 2017)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا (پپتیدهای سویا، گندم سیاه، پنبه‌دانه، تخمه آفتابگردان، بادام‌زمینی و کدو) (Samaranayaka & Li-Chan, 2011)، کاهش کلسترول (هیدرولیز شده‌های ماهی) (Drotningsvik *et al.*, 2016)، محافظت‌کننده عصبی و آنتی‌اکسیدانی (پپتیدهای گردو) (Wang *et al.*, 2021)، فعالیت ضد سرطانی (Fan *et al.*, 2022)، ضد التهابی (پپتیدهای خیار دریایی) (Zhang *et al.*, 2021) می‌باشند. پیش‌تیمار پروتئین‌ها، قبل از هیدرولیز آنزیمی، جهت بهبود آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین‌های مختلف عمل می‌کند. استفاده از پیش‌تیمار ماکروویو امکان کنترل دقیق دما، گرم شدن یکنواخت نمونه‌ها و کاهش واکنش‌های جانبی نامطلوب را فراهم می کنند. پیش‌تیمار مایکروویو سبب باز شدن ساختار سه‌بعدی پروتئین شده و به افزایش دسترسی آنزیم‌ها به پیوندهای پپتیدی کمک می‌کند (Uluko *et al.*, 2015). اولوکو و همکاران (Uluko *et al.*, 2015) گزارش کردند که استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو باعث افزایش درجه هیدرولیز و پایداری هیدرولیز شده‌های پروتئین آب‌پنیر می‌شود. گازیکالوویچ و همکاران (Gazikalović *et al.*, 2021) بیان کردند که مایکروویو تأثیر قابل‌توجهی بر ساختار گلوتن و آلرژی‌زایی دارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، هیدرولیز شده‌های پروتئینی با ویژگی آنتی اکسیدانی مناسب تولید می‌کند. هدف از این پژوهش بررسی کارایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های پروتئین دانه کدو توسط آلکالاز در شرایط بدون پیش‌تیمار و با استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو می‌باشد.

مواد و روش ها

مواد

ابتدا میوه کدو (*Cucurbita maxima* L.) از بازار محلی آستانه اشرفیه در استان گیلان تهیه شد و پس از جداسازی دانه‌ها به‌صورت دستی، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در آون خشک شدند (Sitohy *et al.*, 2020). آنزیم آلکالاز با اکتیویته ۲/۹۷ U/ml، اسید سولفوریک، سود، اسید بوریک،اسید کلریدریک، معرف متیل‌رد، هگزان، Na_2HPO_4-NaH_2PO_4، متانول، $FeCl_2$، فروزین و آمونیوم مولیبدات مورد استفاده در آزمایشات از شرکت‌های معتبر مرک آلمان، سیگما آلدریچ آمریکا و مجللی ایران خریداری شدند.

روش‌ها

تولید کنسانتره پروتئینی

دانه‌های خشک‌شده، بدون پوست‌گیری، توسط آسیاب (500 A، چین) کاملاً پودر شده و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. حلال هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ وزنی/حجمی به پودر اضافه شد و توسط شیکر (نورصنعت فردوس، ایران) با سرعت ۴۴۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴ ساعت مخلوط شدند. عمل حذف روغن تا کاهش آن به حدود ۵ درصد ادامه یافت. حلال باقیمانده در کنجاله در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت توسط آون تحت خلأ (Memmert، آلمان) جدا شد. کنجاله به نسبت ۱ به ۱۰ وزنی/حجمی در آب مقطر پخش شده و pH محلول به‌منظور باز شدن ساختمان پروتئین، توسط سود ۱ نرمال به ۱۱ رسانیده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه توسط همزن مغناطیسی (Jenway، انگلستان) مخلوط شد. پس از آن عمل سانتریفیوژ به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Combi-514R، کره جنوبی) انجام شد و با جمع‌آوری محلول رویی یا سوپرناتانت، باقی‌مانده در آب مقطر حل شده و استخراج سوپرناتانت دوباره تکرار شد. سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ نرمال، pH آن روی ۴ تنظیم شد، عمل سانتریفیوژ مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه تکرار شد. در نهایت رسوب حاصل توسط خشک‌کن انجمادی (FDB 5503، کره جنوبی) خشک شده و در ظروف دربسته، محیط خشک و خنک نگهداری شد (Mazloomi-Kiyapey *et al.*, 2019).

آزمون‌های شیمیایی

محتوای پروتئین

۲ گرم از نمونه به‌همراه ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و یک عدد قرص کلدال (کاتالیزور) به درون لوله هضم افزوده شد و بعنوان شاهد، از یک لوله هضم بدون نمونه و فقط حاوی اسید و کاتالیزور استفاده شد. عملیات هضم با توان ۸۰ (وات) دستگاه به‌مدت ۱۲۰ دقیقه تا شفاف شدن محتویات دستگاه (InKjel 625 P، آلمان) انجام شد. بعد از خنک شدن و خارج شدن بخارات اسیدی با استفاده از دستگاه تقطیر، توسط سود ۴۰ درصد و اسید بوریک ۴ درصد، تقطیر (FX118-30، آلمان) انجام شد و سپس تیتراسیون نمونه به‌کمک اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تا ارغوانی شدن نمونه در حضور معرف متیل‌رد ادامه یافت. درصد ازت نمونه با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

(۱)

۱۰۰×وزن نمونه/(حجم اسید مصرفی شاهد−حجم اسید مصرفی نمونه)×نرمالیته اسید مصرفی×۱/۴=درصد ازت نمونه

برای محاسبه درصد پروتئین نمونه، ازت کل را در فاکتور پروتئینی (۶/۲۵) ضرب می‌کنیم (Salo-väänänen *et al.*, 1996).

محتوای رطوبت

مقدار ۵ گرم از نمونه در ظرف آلومینیومی مخصوص اندازه‌گیری رطوبت توزین شد و در داخل آون (Memmert، آلمان) با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و پس از ۱۵ دقیقه سردشدن در داخل دسیکاتور، توزین انجام شد. این عمل چندین بار تکرار شد تا محتوای رطوبت نمونه به‌مقدار ثابتی رسید. سپس مقدار رطوبت طبق معادله ۲ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

(۲)

۱۰۰×وزن نمونه/(وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن−وزن ظرف و نمونه قبل از خشک کردن)=درصد رطوبت

محتوای خاکستر

در بوته‌چینی با وزن مشخص مقدار ۲ گرم نمونه توزین شد. ابتدا روی هیتر سوزانده شد و پس از آن بوته حاوی نمونه به کوره الکتریکی (Nabertherm، آلمان) با دمای ۶۰۰−۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۶ ساعت انتقال یافت و حرارت‌دهی تا سفید شدن رنگ خاکستر ادامه یافت. درنهایت بعد از ۱۵ دقیقه خشک شدن بوته در دسیکاتور، توزین انجام شد. میزان خاکستر از طریق معادله ۳ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

(۳)

۱۰۰×وزن نمونه/(وزن بوته چینی−وزن بوته و خاکستر)=درصد خاکستر

محتوای چربی

۳ گرم از نمونه روی کاغذ صافی توزین و در داخل کارتوش گذاشته شد. کارتوش به قسمت استخراج دستگاه سوکسله انتقال یافت. بالن با وزن مشخص تا نیمه با حلال هگزان پر شد و سپس به دستگاه متصل شد. عملیات استخراج به‌مدت ۴ ساعت انجام شد. درنهایت برای خارج کردن حلال باقیمانده، بالن محتوی نمونه به آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت سپس بالن مجدا توزین شد. درصد چربی با معادله ۴ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

(۴) ۱۰۰×وزن نمونه/(وزن بالن−وزن بالن و نمونه)=درصد چربی

پیش‌تیمار مایکروویو

محلول پروتئینی از کنسانتره پروتئین دانه کدو با نسبت ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار ($100\ gr\ L^{-1}$) ($pH=7/4$) (Na_2HPO_4-NaH_2PO_4) تهیه شد. محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه جهت هیدراته شدن کامل، هم‌زده شد و سپس در معرض امواج مایکروویو (Daewoo، کره جنوبی) با توان ویژه ۹۰۰−۴۵۰ وات به‌مدت ۹۰−۳۰ ثانیه قرار گرفت. محلول پروتئینی پیش‌تیمار شده با مایکروویو به‌عنوان محلول سوبسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Gohi *et al.*, 2019). لازم به ذکر است پس از اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی کل، در توان‌ها و زمان‌های مختلف پیش‌تیمار مایکروویو، توان ۶۰۰ وات به‌مدت ۳۰ ثانیه انتخاب و قبل از هیدرولیز آنزیمی اعمال شد.

هیدرولیز آنزیمی

آنزیم آلکالاز در غلظت‌های ۲/۵−۰/۵ درصد وزنی نسبت به سوبسترای پروتئینی اضافه شد و زمان هیدرولیز به‌عنوان یک فاکتور مستقل برای هر یک، طی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار (VS-8480، کره جنوبی) با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. دما و pH هیدرولیز، مطابق دمای اپتیمم (۵۰ درجه سانتی‌گراد) و pH اپتیمم آنزیم ($pH=8$) در نظر گرفته شد. به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبگرم (WNB 22، آلمان) با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس هیدرولیز شده‌ها (مایع رویی) با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به

مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاصل با خشک‌کن انجمادی (FDB 5503، کره جنوبی) برای به‌دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده، خشک شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (Nourmohammadi *et al.*, 2016; Sitohy *et al.*, 2020).

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی

مهار رادیکال آزاد DPPH

هیدرولیز شده‌ها، در آب مقطر با غلظت بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر) حل شدند. سپس به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه، ۶۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار در متانول) اضافه و به‌مدت ۲ دقیقه به‌شدت تکان داده شد و بعد از قرار گرفتن در تاریکی به‌مدت ۳۰ دقیقه، جذب در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis (مدل T80، انگلستان) اندازه‌گیری شد. شاهد، حاوی ۸۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱۵ میلی مولار) بود. توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله ۵ محاسبه شد (Kanbargi *et al.*, 2017).

جذب شاهد/(جذب نمونه-جذب شاهد) =درصد مهار رادیکال DPPH آزاد ×۱۰۰ (۵)

فعالیت شلاته‌کنندگی آهن

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، با ۱۰ میکرولیتر $FeCl_2$ (۲ میلی‌مولار) و ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر، مخلوط شد و پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین[1] (۵ میلی‌مولار)، به‌مدت ۲ دقیقه به‌شدت تکان داده شد. مخلوط به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. کاهش رنگ، به‌دلیل شلاته‌شدن آهن، با اندازه‌گیری جذب در ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد حاوی ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر $FeCl_2$ و ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین (۵ میلی‌مولار) بود. درصد شلاته‌کنندگی با استفاده از معادله ۶ محاسبه شد (Kanbargi *et al.*, 2017).

(۶) ۱۰۰× جذب شاهد/(جذب نمونه - جذب شاهد) =درصد شلاته کنندگی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی لیتر از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به‌مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب (WNB 22، آلمان) ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بالاتر بود (Prieto *et al.*, 1999).

بهینه‌سازی فرآیند

شرایط هیدرولیز، با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۱ و روش سطح پاسخ، در قالب طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شد. فاکتورهای مستقل، نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا (X_1) و زمان هیدرولیز (X_2) در پنج سطح (α+، ۱+، ۰، ۱-، α-) و سه نقطه مرکزی آزمایش شدند. پاسخ‌های مورد بررسی، شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، شلاته‌کنندگی یون آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH بود. اثر متغیرهای مستقل بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ ارزیابی شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. آزمون‌ها با ۳ تکرار انجام شد و متوسط نتایج گزارش گردید. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج و بحث

میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۲، میزان چربی دانه کامل نسبت به کنسانتره پروتئین دانه، کاهش قابل توجهی داشت که دلیل آن، استفاده از حلال هگزان جهت چربی‌زدایی از کنجاله و کارایی بالای حلال هگزان در چربی‌زدایی، استخراج پروتئین در محلول قلیایی و ترسیب پروتئین‌ها در نقطه ایزوالکتریک می‌باشد. کمترین میزان رطوبت مربوط به کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن استفاده از آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت حذف هگزان باقیمانده پس از فرآیند چربی‌زدایی و استفاده از خشک‌کن انجمادی به‌منظور خشک کردن رسوب پروتئینی بعد از فرآیند استخراج می‌باشد. مقدار پروتئین و چربی در دانه کامل مشابه گزارشات دوی و همکاران (Devi *et al.*, 2018) و همچنین رزیگ و همکاران (Devi *et al.*, 2018; Rezig *et al.*, 2012) بود. مقدار پروتئین و چربی کنسانتره کمی متفاوت از مقدار گزارش داده شده توسط ذاکری و همکاران (Zakeri *et al.*, 2019) بود. لازم به ذکر است که این اختلافات ناشی از تفاوت در گونه‌های مورد استفاده است. با توجه به جدول ۲، کمترین میزان خاکستر مربوط به کنسانتره پروتئینی می‌باشد که دلیل آن فرایند استخراج پروتئین در pH ۱۱ و حذف مقادیر زیادی ترکیبات غیرپروتئینی است.

1- Ferrozine

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین دانه کدو

Table 1- Levels of independent variables used to optimize the antioxidant activities of pumpkin seed protein

متغیرهای مستقل Independent variables	-α	-1	0	+1	+α
سوبسترا/آنزیم E/S	0.5	0.8	1.5	2.2	2.5
زمان Time	20	45	105	165	190

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی موجود در دانه کامل، کنجاله چربی‌گیری شده و کنسانتره پروتئین کدو

Table 2- Chemical compounds present in whole grain, defatted flour and pumpkin protein concentrate

نمونه Sample	رطوبت (درصد) Moisture	خاکستر (درصد) Ash	چربی (درصد) Fat	پروتئین (درصد) Protein
دانه کامل Whole grain	8.46	6.9	31.57	33.92
کنجاله چربی‌گیری شده Defatted flour	7.65	4.65	5.12	59.5
کنسانتره پروتئین کدو Pumpkin protein concentrate	5.45	1.45	2.29	65.62

جدول ۳- تیمارهای تصادفی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بدون پیش‌تیمار

Table 3- Random treatments and antioxidant activity of hydrolyzed pumpkin seed protein without pretreatment

تیمار Treatment	زمان Time	سوبسترا/آنزیم E/S	آنتی‌اکسیدانی کل Total anti-oxidant	DPPH %	درصد شلاته‌کنندگی Chelation activity %
1	20	1.5	0.654	25.2	79.6
2	45	0.8	0.625	22.3	76.5
3	45	2.2	0.684	26.5	83.6
4	105	0.5	0.637	23.6	81.1
5	105	1.5	0.714	31.2	89.2
6	105	1.5	0.72	32.8	88.5
7	105	1.5	0.725	33.5	87.8
8	105	2.5	0.764	37.5	90.5
9	165	0.8	0.658	25.5	84.6
10	165	2.2	0.79	40.5	96.2
11	190	1.5	0.725	33.5	89.5

جدول ٤- تیمارهای تصادفی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت پیش‌تیمار مایکروویو

Table 4- Random treatments and antioxidant activity of hydrolyzed pumpkin seed protein under microwave pretreatment

تیمار Treatment	زمان Time	سوبسترا/آنزیم E/S	آنتی‌اکسیدانی کل Total anti-oxidant	DPPH %	درصد شلاته کنندگی Chelation activity %
1	20	1.5	0.654	25.7	84.8
2	45	0.8	0.625	23.1	80.2
3	45	2.2	0.665	28.3	86
4	105	0.5	0.613	22.5	80
5	105	1.5	0.688	51	93
6	105	1.5	0.711	50.8	91
7	105	1.5	0.701	52	92
8	105	2.5	0.691	35	89
9	165	0.8	0.632	26	81
10	165	2.2	0.688	40.2	89.7
11	190	1.5	0.642	37	84.3

بهینه‌سازی هیدرولیز کنسانتره پروتئین کدو

تأثیر متغیرهای مستقل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا تحت پیش‌تیمار مایکروویو بر درصد شلاته‌کنندگی، آنتی‌اکسیدانی کل و مهار رادیکال آزاد DPPH با تجزیه و تحلیل ضرایب رگرسیونی و واریانس ذکر شده در جدول ۳ و جدول ۴ مورد بررسی قرار گرفت.

تأثیر زمان و E/S بر فعالیت شلاته‌کنندگی بدون استفاده از پیش‌تیمار

با توجه به عدد P بدون پیش‌تیمار جدول ۵، استنباط می‌شود، مقادیر A^2، A و B تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت شلاته‌کنندگی آهن می‌گذارند ($p<0/05$). متغیر A^2، نسبت به سایر متغیرها تأثیرگذارتر می‌باشد. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ($0/05<p$)، بیانگر مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی است. رابطه شلاته‌کنندگی یون آهن با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۶۷۹ توانایی خوب مدل در پیش‌بینی تأثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد که از معادله ۷ پیروی می‌کند.

$$88.50-1.96\ A^2+4.00\ B+4.34\ A \quad (۷)$$

جدول ۵- آنالیز واریانس فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط آلکالاز

Table 5- Variance analysis of chelation activity of pumpkin seed protein hydrolysate by alcalase

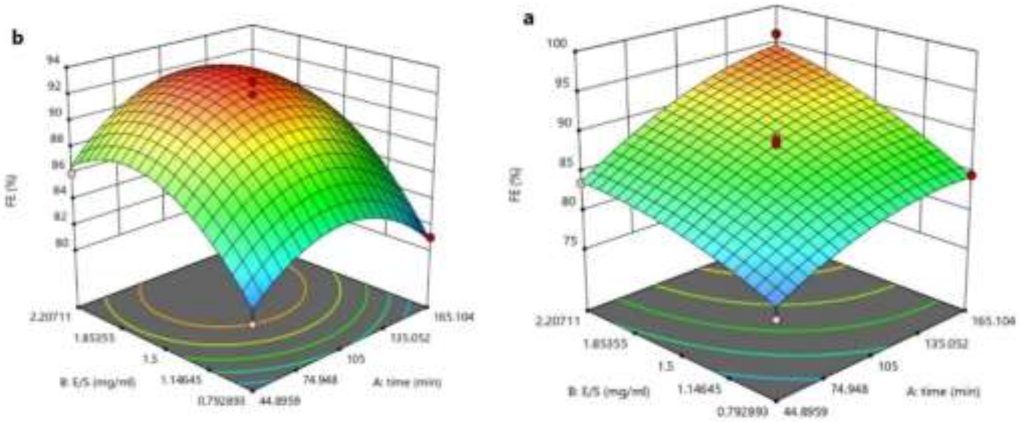
	ضریب رگرسیون Regression coefficient		ارزش p P_{Value}		درجه آزادی df	
	P	BP	P	BP	P	BP
مدل Model	92.00	88.50	0.0006	0.0010	5	5
A	0.4741	4.34	0.2741	0.0004	1	1
B	3.40	4.00	0.0003	0.0005	1	1
AB	0.7250	1.13	0.2416	0.1769	1	1
A^2	-3.80	-1.96	0.0004	0.0225	1	1
B^2	-3.82	-1.34	0.0004	0.0771	1	1
R^2-پیش‌بینی شده Pred-R^2	0.8576	0.7865				
R^2-تعیین‌شده Adj-R^2	0.9480	0.9358				
عدم تناسب Lack of fit			0.4583	0.1399	3	3

A : زمان، B: E/S، BP: بدون پیش‌تیمار و P: با پیش‌تیمار مایکروویو

با توجه به شکل ۱ الف، در نسبت ۲/۲ درصد E/S و زمان ۱۶۵ دقیقه بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی (۹۶٫۲٪) را خواهیم داشت و کمترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی (۷۶٫۵٪) مربوط به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت ۰٫۸ درصد E/S می‌باشد. بطور کلی میزان فعالیت شلاته کنندگی تا زمان ۱۶۵ دقیقه افزایش و پس از آن کاهش‌یافته است که احتمالا به‌دلیل تولید پپتیدهای کوتاه زنجیری است که توانایی کمی در فعالیت شلاته‌کنندگی آهن از خود نشان می‌دهند (Maqsoudlou *et al.*, 2018). بعبارت دیگر، هیدرولیز محدود، منجر به تولید توالی‌های پپتیدی می‌شود که توانایی بالاتری در مهار یون آهن از خود نشان می‌دهند. مشابه یافته‌های کاوه و همکاران (Kaveh *et al.*, 2019) که تأثیر منفی افزایش زمان و درجه هیدرولیز بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده شنبلیله را مشاهده کردند. از طرف دیگر، با افزایش نسبت E/S، میزان فعالیت شلاته‌کنندگی نیز افزایش یافت. این افزایش، احتمالا بدلیل ازدیاد تعداد جایگاه‌های فعال در دسترس برای هیدرولیز سوبسترا و شکسته شدن پیوندهای پپتیدی بیشتر است که در نتیجه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد.

تأثیر زمان و E/S بر فعالیت شلاته‌کنندگی با اعمال پیش تیمار

نتایج بدست آمده از شکل ۱ ب، حاکی از آن است که بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی مربوط به زمان ۱۰۵ دقیقه و E/S ۱٫۵ درصد می‌باشد. این مقدار بیشینه، نسبت به شرایط بدون پیش‌تیمار، در زمانی کوتاه‌تر و غلظت پایین‌تر آنزیم اتفاق افتاده است. احتمالا، بدلیل اینکه مایکروویو می‌تواند تغییراتی در ساختارهای دوم و سوم پروتئین‌ها ایجاد کند، با باز کردن ساختار پروتئین‌ها، دسترسی آنزیم به پیوندهای پپتیدی را افزایش می‌دهد (Li *et al.*, 2013). گوهی و همکاران (Gohi *et al.*, 2019) گزارش کردند که مایکروویو همراه با پاپائین می‌تواند عملکرد تولید پپتیدهای زیست‌فعال از دانه نیلوفر را بهبود بخشد.



شکل ۱- تأثیر زمان و E/S بر روی فعالیت شلاته کنندگی بدون پیش‌تیمار (الف) و تأثیر زمان و E/S بر روی فعالیت شلاته‌کنندگی با اعمال پیش تیمار (ب)

Fig. 1. Effect of time and E/S on chelation activity without pretreatment (a) and Effect of time and E/S on chelation activity with pretreatment (b)

گازیکالوویچ و همکاران (Gazikalović *et al*., 2021) بیان کردند، در مقایسه با عملیات حرارتی، به نظر می‌رسد که پیش‌تیمار مایکروویو بر ساختار گلوتن و آلرژی‌زایی تأثیر می‌گذارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی مناسب تولید می‌کند. نگوین و همکاران (Nguyen *et al*., 2017) بیان کردند که هیدرولیز آنزیمی به‌همراه پیش‌تیمار مایکروویو روشی مناسب برای تولید هیدرولیز شده‌های پروتئین ماهی با ویژگی های آنتی‌اکسیدانی مناسب می‌باشد.

تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بدون پیش‌تیمار

با توجه به مقادیر عدد P بدون پیش‌تیمار جدول ۶، مقادیر A، A^2، B و AB بر فعالیت DPPH تأثیرگذار می‌باشند ($p<0/05$). A^2 نسبت به سایر متغیرها تأثیرگذارتر است. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ($0/05<p$)، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مطابقت دارد. رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۷۲۸ می‌باشد که نشان می‌دهد مدل توانسته ۹۷/۲۸ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش‌بینی کند. معادله ۸، روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان می‌دهد.

$$32.50+2.70AB-1.89A^2+3.62A+4.86B \qquad (۸)$$

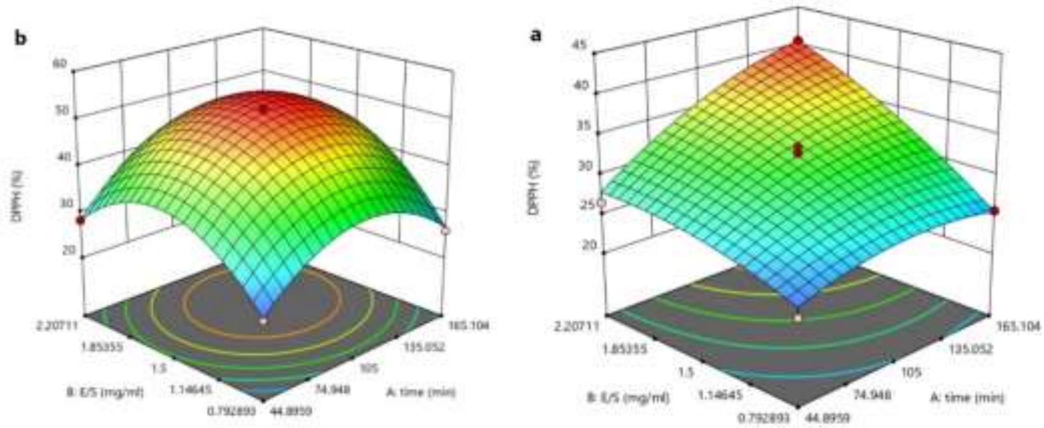
جدول ٦- آنالیز واریانس مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط آلکالاز

Table 6- Variance analysis of free radical scavenging activity DPPH of pumpkin seed protein hydrolysate by alcalase

	ضریب رگرسیون Regression coefficient		ارزش p P_{Value}		درجه آزادی df	
	P	BP	P	BP	P	BP
مدل Model	51.27	32.50	<0.0001	0.0006	5	5
A	3.85	3.62	<0.0001	0.0007	1	1
B	4.63	4.86	<0.0001	0.0002	1	1
AB	2.25	2.70	0.0011	0.0116	1	1
A^2	-10.12	-1.89	<0.0001	0.0233	1	1
B^2	-11.42	-1.29	<0.0001	0.0790	1	1
R^2-پیش‌بینی شده Pred-R^2	0.9912	0.8448				
R^2-تعیین‌شده Adj-R^2	0.9967	0.9457				
عدم تناسب Lack of fit			0.5034	0.3989	3	3

A: زمان، B: E/S، BP: بدون پیش‌تیمار و P: با پیش‌تیمار مایکروویو

مطابق شکل ۲ الف، می‌توان بیان نمود که طی زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت ۲/۲ درصد E/S، بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را خواهیم داشت و ادامه فرایند هیدرولیز منجر به کاهش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH خواهد شد. احتمالا پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده است (Meshginfar *et al*., 2014). شعبان پور و همکاران (Shaban Pour *et al*., 2017) گزارش کردند که قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH پپتیدهای حاصل از پروتئین میگو، با افزایش زمان هیدرولیز، کاهش می‌یابد. در گزارشی دیگر باتیستا و همکاران (Batista *et al*., 2010) گزارش کردند، افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH می‌شود. اویسی‌پور و همکاران (Ovissipour *et al*., 2009) به بررسی تأثیر زمان بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پپتیدهای "گونه‌ای از ماهی" پرداختند و گزارش آنها حاکی از آن بود که با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه، بالاترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را خواهیم داشت و با افزایش بیشتر زمان، این فعالیت کاهش خواهد یافت. این اختلاف در گزارشات ناشی از تفاوت در ماده اولیه، نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز می‌باشد. در مطالعه حاضر، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۲ درصد منجر به افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH شد و در غلظت بالاتر منجر به کاهش فعالیت شد. علت این امر را می‌توان به هیدرولیز بیش از حد پروتئین نسبت داد که منجر به رهایش کامل آمینواسیدهای هیدروفیل شده و سبب دشوار شدن واکنش آمینواسیدهای فعال با رادیکال DPPH محلول در چربی می‌شود (Zhu *et al*., 2008). نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi *et al*., 2016) گزارش کردند افزایش غلظت آنزیم از ۱/۵ تا ۲ درصد، منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در هیدرولیزشده‌های پروتئین کدو شد و در غلظت‌های کمتر از ۱/۵ درصد، این فعالیت کاهش یافت. باتیستا و همکاران (Batista *et al*., 2010) گزارش کردند در هیدرولیز آنزیمی پروتئین ماهی "گونه‌ای از ماهی" توسط آنزیم پروتامکس، افزایش غلظت آنزیم و افزایش درجه هیدرولیز، منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می شود که دلیل این امر، افزایش پپتیدهای دهنده هیدروژن به‌دلیل افزایش درجه هیدرولیز پروتئین می‌باشد.



شکل ۲- تأثیر زمان و E/S بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بدون پیش‌تیمار (الف) و تأثیر زمان و E/S بر روی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با اعمال پیش‌تیمار (ب)

Fig. 2. The effect of time and E/S on DPPH free radical inhibition activity without pretreatment (a) and The effect of time and E/S on DPPH free radical inhibition activity with pretreatment (b)

تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با اعمال پیش‌تیمار

با توجه به شکل ۲ ب، با اعمال فرآیند پیش‌تیمار مایکروویو، بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد اتفاق افتاد یعنی در مقایسه با شرایط بدون پیش‌تیمار، در زمان کمتر و غلظت پایین‌تر آنزیم به بیشینه فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH دست یافتیم. یانگ و همکاران (Yang *et al*., 2022) تأثیر پیش‌تیمار مایکروویو بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH "بر روی هیدرولیز شده‌های پروتئین شیر" را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند توان های مختلف پیش‌تیمار مایکروویو انجام گرفته بر روی هیدرولیز شده‌های پروتئین شیر، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بالاتری را در مقایسه با شاهد نشان دادند و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با مایکروویو با توان ۳۰۰ وات، بالاترین مقدار می‌باشد. دنگ و همکاران (Dong *et al*., 2015) گزارش کردند پیش‌تیمار مایکروویو با توان ۴۰۰ وات، سبب بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هیدرولیز شده‌های کنجاله آفتابگردان می‌شود. این تفاوت در توان‌های مورد

استفاده در مطالعات مختلف، ممکن است به‌میزان حلالیت مواد پروتئینی مرتبط باشد. هیدرولیز شده‌های پروتئین شیر در مقایسه با پروتئین نامحلول، با قدرت مایکروویو کمتری تحت تأثیر قرار می‌گیرند (Yang *et al*., 2022).

تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بدون پیش‌تیمار

با توجه به مقادیر عدد P بدون پیش‌تیمار جدول ۷، می‌توان بیان کرد که مقادیر A^2، B^2، A، B و AB بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل تأثیرگذار می‌باشند ($p<0/05$). A^2 نسبت به سایر متغیرها تأثیرگذارتر است. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ($p>0/05$)، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مطابقت دارد. رابطه آنتی‌اکسیدانی کل با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۸۸۱ می‌باشد که نشان می دهد مدل توانسته ۹۸،۸۱ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش‌بینی کند. معادله ۹ روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل را نشان می‌دهد.

$$0.7197+0.0182AB-0.0165A^2-0.0110B^2+0.0299A+0.0463B \quad (۹)$$

جدول ۷- آنالیز واریانس فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط آلکالاز

Table 7- Variance analysis of total antioxidant activity of pumpkin seed protein hydrolysate by alcalase

	ضریب رگرسیون Regression coefficient		ارزش p P_{Value}		درجه آزادی df	
	P	BP	P	BP	P	BP
مدل Model	0.7000	0.7197	0.0031	<0.0001	5	5
A	0.0016	0.0299	0.6866	0.0001	1	1
B	0.0258	0.463	0.0011	<0.0001	1	1
AB	0.0040	0.0182	0.4910	0.0064	1	1
A^2	-0.0254	-0.0165	0.0025	0.0047	1	1
B^2	-0.0234	-0.0110	0.0036	0.0233	1	1
R^2-پیش‌بینی شده Pred-R^2	0.7470	0.9263				
R^2-تعیین‌شده Adj-R^2	0.8963	0.9763				
عدم تناسب Lack of fit			0.6018	0.2633	3	3

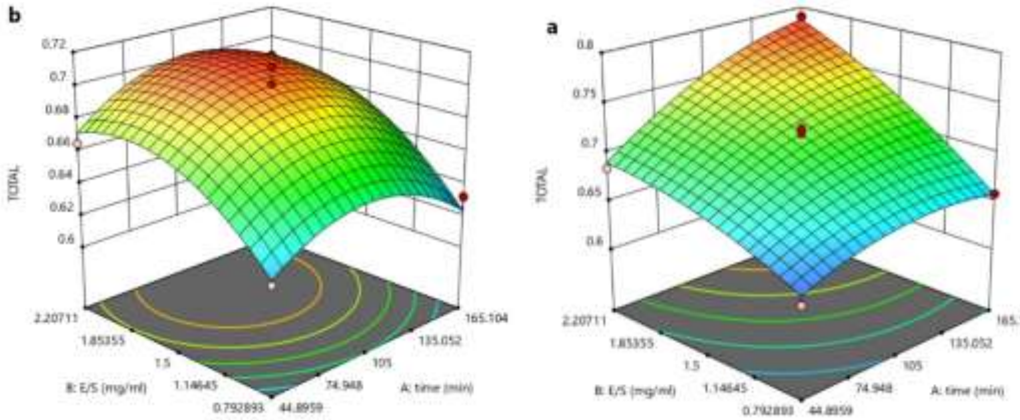
A : زمان، B: E/S، BP: بدون پیش‌تیمار و P: با پیش‌تیمار مایکروویو

طبق شکل ۳ الف، در زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت ۲/۲ درصد E/S، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل را خواهیم داشت و افزایش بیشتر زمان و غلظت آنزیم، بر قدرت آنتی‌اکسیدانی کل تأثیر منفی خواهد گذاشت. نتایج نشان می‌دهد که آنزیم آلکالاز با شکستن زنجیره پروتئینی توانسته است پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی تولید کند که منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیبات پایدارتر شده که در نتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافته است. بنابراین زمان بالاتر و غلظت بیشتر آنزیم، سبب هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت الکترون دهندگی شده و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کاهش یافت. کاوه و همکاران (Kaveh *et al*., 2019) با هیدرولیز پروتئین شنبلیله بیان کردند با افزایش زمان و دما، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. الوند و همکاران (Alvand *et al*., 2022) به بررسی تأثیر زمان و نوع آنزیم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده خربزه ترکمنی پرداختند و بیان کردند آنزیم پانکراتین در زمان ۱۸۰ دقیقه بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل را از خود نشان می‌دهد.

تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با اعمال پیش‌تیمار

شکل ۳ ب، بیانگر بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد می‌باشد. همانطور که ملاحظه می‌شود با اعمال فرآیند پیش‌تیمار میتوان در زمان کوتاه‌تر و غلظت آنزیم پایین‌تر نسبت به شرایط بدون پیش‌تیمار به بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل دست یافت. یانگ و همکاران (Yang *et al*., 2022) تأثیر پیش‌تیمار مایکروویو بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری محصولات آنزیمی پروتئین شیر را مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که توان ۳۰۰ وات باعث بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل می شود. داروزا و همکاران (da Rosa *et al*., 2019) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ زیتون با استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت

پرداختند و دریافتند که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با پیش تیمار مایکروویو در دمای ۸۶ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳ دقیقه بدست می‌آید. تفاوت در توان و زمان مورد استفاده در مطالعات مختلف ممکن است با میزان حلالیت مواد پروتئینی، مرتبط باشد (Yang *et al.*, 2022).



شکل ۳- تأثیر زمان و E/S بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بدون پیش‌تیمار (الف) و تأثیر زمان و E/S بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با اعمال پیش‌تیمار (ب)

Fig. 3. Effect of time and E/S on total antioxidant activities without pretreatment (a) and Effect of time and E/S on total antioxidant activities with pretreatment (b)

نتیجه‌گیری

پپتیدهای زیست‌فعالی که از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی می‌باشند. دانه کدو می‌تواند بعنوان منبعی غنی از مواد مغذی و ترکیبات زیست‌فعال در صنایع‌غذایی گوناگون کاربرد داشته باشد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو در زمان کوتاه‌تر و غلظت آنزیم کمتر (۱۰۵ دقیقه و E/S ۱٫۵ درصد) نسبت به شرایط بدون پیش‌تیمار (زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت E/S ۲/۲ درصد) بدست آمده است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پیش تیمار مایکروویو، روشی مناسب برای صرفه‌جویی در زمان و غلظت آنزیم مورد استفاده در هیدرولیز آنزیمی می‌باشد.

References

1. Alvand, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H., & Kaveh, S. (2022). Comparison of the antioxidant properties of hydrolyzed Turkmen melon seed protein by Pancreatin and Alcalase. *Food Engineering Research*, *21*(2), 75-90. https://doi.org/10.22092/fooder.2023.354314.1303
2. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., & Nunes, M. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, *45*(1), 18-24.
3. da Rosa, G.S., Vanga, S.K., Gariepy, Y., & Raghavan, V. (2019). Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *58*, 102234. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102234
4. Devi, N.M., Prasad, R., & Palmei, G. (2018). Physico-chemical characterisation of pumpkin seeds. *International Journal of Chemical Studies*, *6*(5), 828-831.
5. Dong, C., Li, F., Wang, L., Ma, X., Xu, J., & Kong, L. (2015). Microwave pretreatment of sunflower meal protein preparation of antioxidant peptides. *Science Technology Food Industry*, *36*, 308-311.
6. Drotningsvik, A., Mjøs, S.A., Pampanin, D.M., Slizyte, R., Carvajal, A., Remman, T., Høgøy, I., & Gudbrandsen, O.A. (2016). Dietary fish protein hydrolysates containing bioactive motifs affect serum and adipose tissue fatty acid compositions, serum lipids, postprandial glucose regulation and growth in obese Zucker fa/fa rats. *British Journal of Nutrition*, *116*(8), 1336-1345. https://doi.org/10.1017/S0007114516003548
7. Fan, X., Guo, H., Teng, C., Zhang, B., Blecker, C., & Ren, G. (2022). Anti-colon cancer activity of novel peptides isolated from in vitro digestion of quinoa protein in Caco-2 cells. *Foods*, *11*(2), 194.

8. Gazikalović, I., Mijalković, J., Šekuljica, N., Jakovetić Tanasković, S., Đukić Vuković, A., Mojović, L., & Knežević-Jugović, Z. (2021). Synergistic effect of enzyme hydrolysis and microwave reactor pretreatment as an efficient procedure for gluten content reduction. *Foods*, *10*(9), 2214.
9. Gohi, B.F.C.A., Du, J., Zeng, H.-Y., Cao, X.-J., & Zou, K.M. (2019). Microwave pretreatment and enzymolysis optimization of the Lotus seed protein. *Bioengineering*, *6*(2), 28.
10. Han, R., Álvarez, A.J.H., Maycock, J., Murray, B.S., & Boesch, C. (2021). Comparison of alcalase-and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates–experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties. *Current Research in Food Science*, *4*, 141-149.
11. Horax, R., Vallecios, M.S., Hettiarachchy, N., Osorio, L.F., & Chen, P. (2017). Solubility, functional properties, ACE- I inhibitory and DPPH scavenging activities of Alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, *52*(1), 196-204. https://doi.org/10.1111/ijfs.13267
12. Horwitz, W., & Latimer, G. (2000). Association of official analytical chemists. *Gaithersburg, MD, USA*.
13. Kanbargi, K.D., Sonawane, S.K., & Arya, S.S. (2017). Encapsulation characteristics of protein hydrolysate extracted from *Ziziphus jujube* seed. *International Journal of Food Properties*, *20*(12), 3215-3224.
14. Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M., & Sarabandi, K. (2019). Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek seed's protein hydrolysate by response surface methodology. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *14*(1).
15. Li, D., Wang, J., Wu, X., Feng, C., & Li, X. (2013). Ultraviolet-assisted synthesis of hourglass-like ZnO microstructure through an ultrasonic and microwave combined technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, *20*(1), 133-136. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.017
16. Lu, D., Peng, M., Yu, M., Jiang, B., Wu, H., & Chen, J. (2021). Effect of enzymatic hydrolysis on the zinc binding capacity and in vitro gastrointestinal stability of peptides derived from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 647782.
17. Maqsoudloua, S., Mahoonak, R., & Mohebodini, A. (2018). Evaluation of the antioxidant properties Hydrolyzed protein of bee pollen. *Food Science and Technology*, *14*(12), 227-240.
18. Mazloomi-Kiyapey, S.N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E., & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *Arya Atherosclerosis*, *15*(5), 218.
19. Meshginfar, N., Sadeghi, M.A., Ziaiifar, A., Ghorbani, M., & Kashaninejad, M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Journal of Food Research (University of Tabriz).*
20. Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y.H.B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A.M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout O*ncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries Science*, *83*, 317-331.
21. Nkosi, C.Z. (2007). *Effect of pumpkin seed (Cucurbita pepo) protein isolate on the antioxidant enzymes in ccl4-induced liver injury in low-protein fed rats.*
22. Nnamezie, A.A., Famuwagun, A.A., & Gbadamosi, S.O. (2021). Characterization of okra seed flours, protein concentrate, protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Food Production, Processing and Nutrition*, *3*, 1-14.
23. Nourmohammadi, E., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2016). Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin.
24. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, *115*(1), 238-242.
25. Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, *269*(2), 337-341.
26. Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarrondo, M.L., Hessini, K., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(32), 7715-7721. https://doi.org/10.1021/jf402323u
27. Rezig, L., Chouaibi, M., Msaada, K., & Hamdi, S. (2012). Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, *37*(1), 82-87.
28. Samaranayaka, A.G., & Li-Chan, E.C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, *3*(4), 229-254. https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006

29. Sarkar, S.K., Hossain, M.T., Uddin, M.B., & Absar, N. (2007). Purification, characterization and physico-chemical properties of three galactose-specific lectins from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed kernels. *Journal of the Chinese Chemical Society*, *54*(6), 1433-1442.
30. Shaban Pour, B., Kord Jazi, M., Nazari, K., & Esmaeeli Khariki, M. (2017). Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on antioxidant properties of prawn bioactive peptides. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, *14*(62), 45-31.
31. Shandilya, U., & Sharma, A. (2017). Functional foods and their benefits: an overview. *Journal Nutrition Health Food Engineering*, *7*(4), 353-356.
32. Sitohy, M.Z., Desoky, E.S.M., Osman, A., & Rady, M.M. (2020). Pumpkin seed protein hydrolysate treatment alleviates salt stress effects on *Phaseolus vulgaris* by elevating antioxidant capacity and recovering ion homeostasis. *Scientia Horticulturae*, *271*, 109495. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109495
33. Taha, F.S., Mohamed, S.S., Wagdy, S.M., & Mohamed, G.F. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Science Journal*, *21*(5), 651-658.
34. Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1138-1146.
35. Villanueva-Lazo, A., Paz, S. M.-d. l., Rodriguez-Martin, N. M., Millan, F., Carrera, C., Pedroche, J. J., & Millan-Linares, M. d. C. (2021). Antihypertensive and antioxidant activity of Chia protein techno-functional extensive hydrolysates. *Foods*, *10*(10), 2297.
36. Wang, S., Su, G., Zhang, X., Song, G., Zhang, L., Zheng, L., & Zhao, M. (2021). Characterization and exploration of potential neuroprotective peptides in walnut (*Juglans regia*) protein hydrolysate against cholinergic system damage and oxidative stress in scopolamine-induced cognitive and memory impairment mice and zebrafish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(9), 2773-2783. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07798
37. Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., & Wu, Y. (2019). Effect of pyrogallic acid (1, 2, 3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. *Lwt*, *109*, 443-449. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.034
38. Yang, X., Ren, X., & Ma, H. (2022). Effect of microwave pretreatment on the antioxidant activity and stability of enzymatic products from milk protein. Foods 2022, 11, 1759. In: s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published.
39. Zakeri, K., Ghorbani, M., Mahoonak, A.S., Moayedi, A., & Maghsoudlou, Y. (2019). Determination of optimum conditions for the production of peptides with antioxidant and nitric-oxide inhibition properties from protein hydrolysis of pumpkin seed meals using pepsin enzyme. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, *14*(3).
40. Zhang, X., Li, H., Wang, L., Zhang, S., Wang, F., Lin, H., Gao, S., Li, X., & Liu, K. (2021). Anti‐ inflammatory peptides and metabolomics‐ driven biomarkers discovery from sea cucumber protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, *86*(8), 3540-3549. https://doi.org/10.1111/1750-3841.15834
41. Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y.L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(8), 2714-2721.
42. Salo-Viiiinhen, P.P., & Koivistoinen, P.E. (1996). Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein (Nx 6.25) values. *Food Chembtry*, *57*(1), 27-31.